

低酸素環境下におけるヒト歯根膜細胞間ギャップ結合の機能性および調節機構の検討

著者	加藤 龍史
号	38
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	歯博第628号
URL	http://hdl.handle.net/10097/59798

氏名(本籍) : 加藤 龍 史

学位の種類 : 博士 (歯 学) 学位記番号 : 歯 博 第 6 2 8 号

学位授与年月日 : 平成 25 年 3 月 27 日 学位授与の要件 : 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科・専攻 : 東北大学大学院歯学研究科(博士課程) 歯科学専攻

学位論文題目 : 低酸素環境下におけるヒト歯根膜細胞間ギャップ結合の機能性および調節機構の検討

論文審査委員 : (主査) 教授 山 本 照 子

教授 市 川 博 之 教授 福 本 敏

論文内容要旨

歯根膜は、矯正歯の移動によって局所的な細胞外環境の変化を受け、周囲領域の骨リモデリングに影響を与える。そして細胞間コミュニケーションによる歯根膜の細胞情報伝達は、これらの変化と密接な関わりを持つと推察される。ギャップ結合は、細胞間情報伝達系の一つとして知られており、隣り合う細胞をつなぎ、無機イオンや水溶性分子を通過させる細胞間結合である。歯根膜細胞にはいくつかのギャップ結合タンパクの存在が報告されているものの、その局在および実際に機能しているのかの詳細については不明な点が多い。本研究は、ギャップ結合を構成する主要タンパクであるコネキシン 43 (Cx-43) に着目し、ヒト歯根膜細胞における局在・機能性の検討を行った。さらに、矯正歯の移動時における圧迫側での歯根膜微小環境モデルとして 2%O₂ の低酸素環境下、または疑似低酸素状態を作り出す薬剤 Deferoxamine mesylate (DFO) 存在下における、Cx-43 の発現と機能性について比較検討を行った。

実験は、岡山大学病院矯正歯科における矯正治療開始患者の便宜抜去した健全な小白歯から歯根膜細胞を単離し、初代培養系において行った。

走査型電子顕微鏡を用いて、単離した歯根膜細胞間の形態学的検討を行った結果、歯根膜細胞同士の間で突起状構造物を伸ばして接触していた。三重蛍光染色像から Cx-43 は細胞間の突起状構造物に局在していることが示された。これらの結果から、歯根膜細胞間におけるギャップ結合の存在が示唆された。ギャップ結合の機能性を、蛍光退色法 (FRAP) により検討を行った結果、周囲細胞からの蛍光色素の再流入による蛍光輝度の回復を確認した。この回復はギャップ結合阻害薬添加群で、有意に減少した。これらの結果から、歯根膜細胞におけるギャップ結合は機能性を有していることが示唆された。Western blotting 法およびリアルタイム PCR を用いて、2% O₂ 環境下または DFO 存在下における HIF-1 α および Apelin の発現検討を行い、低酸素環境となっていることが確認された。DFO 存在

下でFRAPを行った結果、蛍光回復はDFOの濃度依存的また時間依存的に有意に減少した。これらの結果から、歯根膜細胞におけるギャップ結合を介した細胞情報伝達は、低酸素環境で抑制的な調節を受けることが示唆された。三重蛍光染色を用いて、低酸素環境下におけるギャップ結合タンパク発現量の変化を検討した結果、単一細胞面積に占めるCx-43タンパク発現量は有意に減少した。以上の結果から、ヒト歯根膜細胞にはCx-43を介した機能的ギャップ結合が存在し、その細胞間情報伝達系は低酸素環境下において負の制御を受けることを見出した。本研究から、矯正歯の移動時における骨リモデリングに、ギャップ結合を介した歯根膜細胞間コミュニケーションが関与する可能性が示唆された。

審査結果要旨

歯根膜は、矯正歯の移動によって局所的な細胞外環境の変化を受け、周囲領域の骨リモデリングに影響を与える。そして細胞間コミュニケーションによる歯根膜の細胞情報伝達は、これらの変化と密接な関わりを持つと推察される。ギャップ結合は、細胞間情報伝達系の一つとして知られており、隣り合う細胞をつなぐ細胞間結合である。歯根膜細胞にはいくつかのギャップ結合タンパクの存在が報告されているものの、その局在および実際に機能しているのかの詳細については不明な点が多い。本研究は、ギャップ結合を構成する主要タンパクであるコネキシン43 (Cx-43) に着目し、ヒト歯根膜細胞における局在・機能性の検討を行った。さらに、矯正歯の移動時における圧迫側での歯根膜微小環境モデルとして2%O₂の低酸素環境下、または疑似低酸素状態を作り出す薬剤 Deferoxamine mesylate (DFO) 存在下における、Cx-43の発現と機能性について比較検討を行った。走査型電子顕微鏡を用いて、歯根膜細胞間の形態学的検討を行った結果、歯根膜細胞同士の細胞間で突起状構造物を伸ばして接触していた。三重蛍光染色像からCx-43は細胞間の突起状構造物に局在していることが示された。これらの結果から、歯根膜細胞間におけるギャップ結合の存在が示唆された。ギャップ結合の機能性を、蛍光退色法 (FRAP) により検討を行った結果、周囲細胞からの蛍光色素の再流入による蛍光輝度の回復を確認した。この回復はギャップ結合阻害薬添加群で、有意に減少した。これらの結果から、歯根膜細胞におけるギャップ結合は機能性を有していることが示唆された。DFO存在下でFRAPを行った結果、蛍光回復はDFOの濃度依存性また時間依存性に有意に減少した。これらの結果から、歯根膜細胞におけるギャップ結合を介した細胞情報伝達は、低酸素環境で抑制的な調節を受けることが示唆された。三重蛍光染色を用いて、低酸素環境下におけるギャップ結合タンパク発現量の変化を検討した結果、単一細胞面積に占めるCx-43タンパク発現量は有意に減少した。以上の結果から、ヒト歯根膜細胞にはCx-43を介した機能的ギャップ結合が存在し、その細胞間情報伝達系は低酸素環境下において負の制御を受けることを見出した。本研究から、矯正歯の移動時における骨リモデリングに、ギャップ結合を介した歯根膜細胞間コミュニケーションが関与する可能性が示唆された。

本研究で得られた結果は歯根膜の特性、機能を考える上での新たな知見であり、歯周組織の恒常性維持および病態解明への一助となると考えられる。よって本論文は博士（歯学）の学位授与に値する。